



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA

EFFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO
DE *Allium sativum* L. SOBRE *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853,
COMPARADO CON CIPROFLOXACINO

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
MÉDICO CIRUJANO

AUTOR:

EDINSON MONTEZA FARRO

ASESOR:

Mgr. DAVID RENE RODRIGUES DÍAZ

Mgr. JAIME POLO GAMBOA

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Enfermedades Infecciosas y Transmisibles

TRUJILLO – PERÚ

2019

DEDICATORIA

En primer lugar, esta tesis se la dedico a Dios por acompañarme y darme la fuerza, paciencia y Fortaleza para perseverar en el cumplimiento de mis metas, iluminando mi camino para el éxito de mi carrera profesional.

Se lo dedico a mi madre **Esmenia Farro Zelada**, una gran mujer quien me dio la vida y ha velado por mí durante este arduo camino para convertirme en un profesional. Madre todos mis logros son tuyos; Te amo.

A mi padre **Urbano Monteza Perales**, una gran persona quien me apoya y guía en este largo camino, me brindan su amor, confianza y consejo para cada día ser una mejor persona.

EDINSON MONTEZA FARRO

AGRADECIMIENTO

A Dios.

POR GUIAR MIS PASOS Y ESTAR SIEMPRE CUANDO MÁS LO NECESITO Y SER PARTE DE MI VIDA.

A MIS ASESORES: MGTR. DAVID RENE RODRIGUES DÍAZ, MGTR. JAIME POLO GAMBOA Y DRA.
MARÍA ROCÍO DEL PILAR LLAQUE SÁNCHEZ.

A LA UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO QUE ME ACOGIÓ TODO ESTE TIEMPO EN SUS AULAS
BRINDÁNDOME LOS CONOCIMIENTOS VALIOSOS Y ASÍ PODER FORJAR MI PROFESIÓN.

A MIS QUERIDOS MAESTROS POR SUS ENSEÑANZAS, COMPRENSIÓN Y PROFESIONALISMO QUE
NUNCA OLVIDARE.

A MIS FAMILIARES QUIENES CONFIARON EN MÍ Y ME APOYARON EN ESTE LARGO CAMINO.

EDINSON MONTEZA FARRO

DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

Yo, **EDINSON MONTEZA FARRO** con DNI **42726292**, estudiante de la Escuela Profesional de Medicina Humana de la Facultad de Ciencias Médicas, a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, declaro bajo juramento que todos los datos e información que acompañan a la Tesis titulada: **EFFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Allium sativum* L. SOBRE *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, COMPARADO CON CIPROFLOXACINO**, son:

1. De mi autoría.
2. He respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas; por tanto, la tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente.
3. La tesis no ha sido autoplagiada; es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni duplicados ni copiados y por tanto los resultados que se presenten en la tesis se constituirán en aportes a la realidad investigada.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas vigentes de la Universidad César Vallejo.

Trujillo, marzo del 2019.

EDINSON MONTEZA FARRO

PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada: “EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Allium sativum* L. SOBRE *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, COMPARADO CON CIPROFLOXACINO”, la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título Profesional de Médico Cirujano.

EDINSON MONTEZA FARRO.

ÍNDICE

PÁGINA DEL JURADO.....	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD	iv
PRESENTACIÓN.....	v
ÍNDICE.....	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. REALIDAD PROBLEMÁTICA	9
1.2. TRABAJOS PREVIOS	10
1.3. TEORÍAS RELACIONADAS AL TEMA	11
1.4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
1.5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	14
1.6. HIPÓTESIS:	14
1.7. OBJETIVOS:	14
1.7.1. Objetivo general:.....	14
1.7.2. Objetivos específicos:	15
II. METODOLOGÍA.....	16
2.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y TIPO DE INVESTIGACIÓN:.....	16
2.2. Variables y operacionalizaión.....	16
2.3. Población y muestra.....	18
2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.	18
2.5 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS.....	19
2.6 ASPECTOS ÉTICOS.....	19
III. RESULTADOS.	20
IV. DISCUSIÓN.....	24
VI. SUGERENCIAS.....	27
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	28
VIII. ANEXOS	31

RESUMEN

Se evaluó el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de *Allium sativum* “ajo” a las diluciones (de 100%, 75%, 50% y 25%) sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 comparado con ciprofloxacino a 5µg, se realizaron 13 repeticiones por cada grupo de estudio. En cada placa Petri se colocaron 6 discos de los cuales 4 de ellos representaban el extracto de *Allium sativum* a distintas diluciones, el patrón de ciprofloxacino a 5 µg y control neutro con (DMSO), se obtuvo que la media de los halos de inhibición del extracto etanólico de *Allium sativum* al 100% fue 19,7 mm (DE: 1,3 valor máximo de 22 mm y mínimo de 17 mm. IC 95% [18,9 – 20,5], no superando lo establecido por el CLSI (≥ 21 mm) el ciprofloxacino demostró halos de inhibición media de 31.5 mm (DE: $1,3 \pm 0,4$ mm, valor máximo de 32 mm y mínimo de 28 mm, IC 95% [30,8 – 32,1]. El ANOVA fue altamente significativa ($p= 0.000$); La prueba post ANOVA Tukey evidenció a mayor concentración mayor efecto inhibitorio. Se concluyó que el extracto etanólico de *Allium sativum* “ajo” no tuvo efecto antimicrobiano sobre *Pseudomonas aeruginosa*, según los criterios del CLSI (≥ 21 mm).

Palabras claves: Extracto etanólico, *Allium sativum*, *Pseudomonas aeruginosa*, Ciprofloxacino, Efecto antimicrobiano.

ABSTRACT

The antimicrobial effect of ethanol extract of *Allium sativum* "garlic" at dilutions of 100%, 75%, 50% and 25% on *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 strains was evaluated, compared with ciprofloxacin at 5µg. Thirteen repetitions were performed for each study group. Six discs were placed on each Petri-dish, 4 with *Allium sativum* extract at different dilutions, plus ciprofloxacin at 5 µg, and neutral control with DMSO. The mean zone of inhibition obtained for 100% *Allium sativum* ethanol extract was 19.7 mm (SD: 1.3, maximum value of 22 mm and minimum of 17 mm. 95% CI [18.9 - 20.5], not exceeding that established by CLSI (≥ 21 mm). Ciprofloxacin demonstrated mean zones of inhibition of 31.5 mm (SD: 1.3 ± 0.4 mm, maximum value of 32 mm and minimum of 28 mm, 95% CI [30.8 - 32.1]. ANOVA was highly significant ($p= 0.000$); the post-ANOVA Tukey-test showed that the higher the concentration, the greater the inhibitory effect. It is concluded that ethanol extract of *Allium sativum* "garlic" had no antimicrobial effect on *Pseudomonas aeruginosa*, according to the CLSI criteria (≥ 21 mm).

Keywords: Ethanol extract, *Allium sativum*, *Pseudomona aeruginosa*, Ciprofloxacin, Antimicrobial effect.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. REALIDAD PROBLEMÁTICA

El problema de resistencia antimicrobiana continuamente es abordado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), debido a que muchas bacterias entre las que se halla la *Pseudomona aeruginosa* adquirieron cierta fortaleza frente a la antibióticoterapia que tiempo atrás fue sensible, conllevando a una gran preocupación creciente de parte del sector económico y sanitario de los estados adscritos a la OMS en el escenario mundial; por ello a partir del 2015, se propusieron estrategias entre las cuales se halla el estudio e investigación de nuevos productos antimicrobianos, incluyendo la diversidad de productos alternativos naturales.¹

La OMS reportó en el 2017 la necesidad de tener nuevos antibióticos para combatir bacterias multirresistentes, especialmente en nosocomios, asilos de personas de la tercera edad y entre personas internadas que hacen uso de ventiladores artificiales y catéteres endovenosos. Entre estos microorganismos se mencionan la *Pseudomona aeruginosa*, las cuales pueden ocasionar estados infecciosos severos que pueden conllevar a la muerte, incrementando la letalidad intrahospitalaria.²

El *Allium sativum* L conocido también como “ajo”, posee una serie de beneficios, siendo más estudiado especialmente en el escenario farmacológico, como también efectos dentro de la medicina alternativa: como su acción antioxidante, disminuyendo la tensión arterial, reduciendo las concentraciones séricas lipídicas, disminuyendo la formación de ateromas y trombos, así como en efecto antimicrobiana y antifúngica.³

Entre los diversos productos farmacológicos utilizados en el tratamiento para *Pseudomona aeruginosa* se utiliza la amikacina la cual revela que en muchos casos existió una baja resistencia que llegó al 12 %, comparado con otros productos antibióticos. En el Perú también se usa la amikacina para tratamientos contra infecciones contra *Pseudomona aeruginosa*.⁴

1.2. TRABAJOS PREVIOS

Johnson M, et al (Nigeria, 2016) investigaron las propiedades antimicrobianas del extracto acuoso del ajo *Allium sativum* contra algunas bacterias en la que se incluyó a la *Pseudomona aeruginosa*, a través de una investigación basada en la experimentación del extracto acuoso de ajo alcanzó el efecto antimicrobiano a una concentración promedio de 25,3 mg / mL. En cuanto al diámetro del halo inhibitorio éste fue de 28,1±1,8 mm para la *Pseudomona aeruginosa*, en cambio la concentración mínima inhibitoria fue 40 mg/mL.⁵

Zouari R, et al (Tunez, 2014) evaluaron la eficacia del extracto de etanol del ajo como antimicrobiano se ha ligado a la facilidad por la cual las moléculas pasan a través de las membranas celulares y en el bajo nivel de los aminoácidos. Utilizó una concentración de 2,5 mg/mL de extracto etanólico al 100%, obteniéndose un diámetro inhibitorio de 7 mm, en las diluciones menores no se halló diámetros inhibitorios. El efecto antimicrobiano del ajo se atribuye principalmente a los compuestos órganos sulfurados como alicina, ajoeno y dialilo sulfidos, que se ubica en los extractos etanólicos que inhiben el crecimiento in vitro de la *Pseudomona aeruginosa*.⁶

Akintobi O, et al (Nigeria, 2013) investigaron la actividad antimicrobiana del extracto de *Allium sativum* en seis microorganismos, incluyó la *Pseudomona aeruginosa*, usando el extracto etanólico. Dicho extracto fue eficaz contra cuatro bacterias patógenas incluyendo a *Pseudomona aeruginosa*, obteniéndose un halo inhibitorio promedio de 7 mm, similar a lo obtenido con antibióticos aminoglucósidos. Al usar una concentración de 1,3 gr de extracto etanólico el halo inhibitorio fue de 1,3 mm, mientras que una concentración de 1,6 gr. el diámetro del halo inhibitorio se incrementó a 3 mm. El análisis fitoquímico cuantitativo y cualitativo indican que el extracto de *Allium sativum* tiene una buena actividad antimicrobiana, debido al mayor efecto inhibitorio lo que confirma su uso en medicina popular, donde se halló mayor cantidad de taninos y flavinoides, comparado con otros tipos de extractos.⁷

EL-mahmood M. (Nigeria, 2009) evaluó durante dos años la presencia de microorganismos patógenos que causan infecciones a la población hospitalizada, el estudio fue experimental, realizado en 750 muestras. Entre las bacterias se estudió *Pseudomona aeruginosa*; usaron el *Allium sativum* L, a la concentración de 100 mg/mL, en todos los extractos crudos.

Hallaron que la concentración mínima inhibitoria del extracto acuoso para *Pseudomona aeruginosa* fue de 150 mg/mL. El extracto de agua fue más potente que los extractos orgánicos, y todos eran inferiores en la actividad, en comparación con el metronidazol (tratamiento estándar). La *Pseudomona aeruginosa* fue susceptible al extracto acuoso de ajo, en condiciones de pH 4, en donde alcanzó diámetros de inhibición del crecimiento de 23 mm, mientras que a pH 6 alcanzó su máximo diámetro los halos de inhibición, 25mm.⁸

Campos C, et al (Perú, 2017) determinaron la actividad inhibitoria del extracto de tipo acuosa de *Allium sativum* L. en una concentración de 100 mg/mL hasta 500 mg/mL para la *Pseudomona aeruginosa* resistente. El extracto de tipo acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” obtuvo el mayor resultado de inhibición sobre *Pseudomona aeruginosa* resistente con un halo de inhibición promedio de 7,3 mm. Asimismo establecieron la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto acuoso del *Allium sativum* L. a partir de 400 mg/mL en forma descendente hasta 1,56 mg/mL, estableciendo entre 12,3 a 25 mg/mL.⁹

1.3. TEORÍAS RELACIONADAS AL TEMA

Las infecciones intrahospitalarias representan un problema que es abordado continuamente por los servicios que brindan atención en salud especialmente de una de las bacterias que causan mayor número de complicaciones, ésta es la *Pseudomona aeruginosa* que es una bacteria aeróbica y Gram negativa, caracterizada por ser oportunista en el escenario hospitalario, es un microorganismo oxidasa positiva y que crece incluso a temperatura mayor a los 42 °C. En los nosocomios se les puede hallar en respiradores artificiales, equipos de humidificación, vertederos, regaderas, alberca para hidroterapia, incluso en las manos del personal de salud.^{1, 2}

Los pacientes inmunosuprimidos son los que se afectan con más frecuencia, así como aquellos que padecieron de extensas quemaduras corporales, los tratados con quimioterapia o procesos infecciosos del pulmón. Es necesario recalcar la resistencia que tiene este patógeno frente a los antibióticos, que desde el punto de vista fisiopatológico su membrana es permeable, produciendo enzimas inactivadoras de principios activos antimicrobiano, mutando constantemente y mejorando la resistencia antibacteriana.¹⁰

Dentro de la importancia de la *Pseudomona aeruginosa* puede invadir diversas partes corporales, en las personas aparentemente sanas es escasa su colonización. Gran parte de las patologías infecciosas originada por la *Pseudomona aeruginosa* se relaciona al ámbito nosocomial. Los adultos con bronquiectasia son los más afectados, también personas con patologías pulmonares obstructivas crónicas y fibrosis quística tienen un mal pronóstico. En los individuos que usan ventiladores mecánicos es mayor la probabilidad de presentar neumonía debido a la *Pseudomona aeruginosa*, alcanzando una letalidad que supera el 55%, especialmente en individuos considerados como críticos, incluyendo los pacientes que tuvieron trasplantes de órganos, neoplasias y grandes quemados.^{11, 12}

Entre las ventajas o características antimicrobianas, se atribuye al ajo la estimulación de la actividad del macrófago, linfocito y las células Asesino T. También actúa inhibiendo la acción de enzimas como la ciclooxigenasa y lipoxigenasa, disminuyendo la formación de las prostaglandinas y eicosanoides pro-inflamatorios como los tromboxanos A₂ y los leucotrienos. Este efecto se traduce contra microorganismos Gram negativos y Gram positivos, incluso tiene acción sobre agentes micóticos y algunos virales, hay poca evidencia del efecto sobre las toxinas, se señala que 1 mg de alicina tiene el mismo efecto que 15 UI de penicilina. La alicina inactiva las enzimas de los microorganismos por acción del grupo tiol que contiene un grupo sulfhidrilo.¹⁴

El antimicrobiano representa aquel producto fabricado de manera artificial o natural, caracterizado por que su principio activo tiene acción contra las bacterias, los mismos que se sintetizan químicamente o son derivados de otros microorganismos con acción bactericida, el cual puede eliminar al agente biológico o retrasar su división celular mediante mecanismos de tipo inhibitorio en la síntesis de su membrana celular, o modificando su síntesis de proteínas o ácidos nucleicos, modificando así su constitución, como también modificando sus funciones de biosíntesis.¹⁵

El ciprofloxacino integra un grupo de antibióticos que pertenecen a los compuestos denominados fluoroquinolonas. Este producto bactericida es usado como antibiótico de primera línea en la mayoría de infecciones que afecta el tracto urinario. Su mecanismo de acción radica en que inhibe los procesos de la síntesis del ácido desoxirribonucleico en la bacteria. El ciprofloxacino tiene acción antimicrobiana sobre ciertas bacterias entéricas Gram negativas como la *Escherichia coli* y *Klebsiella*, además de la *Pseudomona aeruginosa*,

sin embargo, su actividad es limitada sobre algunas bacterias anaerobias como bacterias gram positivas.¹⁶

Una terapia o tratamiento eficaz, resulta de estimar la capacidad benéfica en circunstancias ideales. La eficacia de una terapia farmacológica ocurre al tenerse un beneficio mayor en los organismos o microorganismos intervenidos comparados con aquellos que son administrados, los cuales son evaluados a través de estudios epidemiológicos experimentales, incluyendo el ensayo clínico aleatorizado, que resulta el más indicado para establecer su eficacia.¹⁷⁻¹⁹

El que un principio activo sea bactericida o bacteriostática, van a depender del mecanismo de acción, así como sus componentes químicos, incluyendo factores contributivos, como el microorganismo etiológico, la cantidad y volumen de inocuo, el grado de concentración obtenida en el sector de infección, el lapso de acción y la diseminación bacteriana.¹

1.4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Tiene efecto antimicrobiano el extracto etanólico de *Allium sativum* “ajo” sobre *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 comparado con ciprofloxacino a 5µg en estudio in vitro?

1.5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La escasa investigación local sobre el efecto antimicrobiano de uno de los productos naturales de mayor uso en la población para la medicina alternativa como es el *Allium sativum* L. “ajo”, ha inspirado el desarrollo de este experimento. Teniendo en cuenta que la población, así como el conjunto de profesionales de la salud, busca alternativas para el tratamiento de infecciones ocasionadas por la *Pseudomona aeruginosa* ya que los fármacos que se encuentran al alcance no cubren sus expectativas.

Los productos farmacéuticos disponibles actualmente usados en el tratamiento contra la *Pseudomona aeruginosa* revisten de alta resistencia antimicrobiana, motivo por la cual se trata de conseguir nuevos productos cuyo principio activo sean más seguros y efectivos que los actualmente existentes. Se eligió estudiar el *Allium sativum* L. “ajo”, por ser una planta con bondades medicinales, y propiedades bactericidas y antimicóticas, incluyendo efectos antifúngicos como antidermatofíticas. El *Allium sativum* L. se comparó con el producto químico cuyo principio activo se denomina ciprofloxacino, usado comúnmente en el tratamiento de la *Pseudomona aeruginosa* y cuya aplicación se realiza a nivel mundial.

1.6. HIPÓTESIS:

H1. El extracto etanólico de *Allium sativum* “ajo” tiene efecto antimicrobiano sobre *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 comparado con ciprofloxacino a 5µg in vitro.

Ho. El extracto etanólico de *Allium sativum* “ajo” no tiene efecto antimicrobiano sobre *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 comparado con ciprofloxacino a 5µg in vitro.

1.7. OBJETIVOS:

1.7.1. Objetivo general:

Evaluar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de *Allium sativum* “ajo” sobre *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 comparado con ciprofloxacino a 5 µg in vitro.

1.7.2. Objetivos específicos:

- Establecer el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de *Allium sativum* “ajo” al 100%.
- Establecer el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de *Allium sativum* “ajo” al 75%.
- Establecer el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de *Allium sativum* “ajo” al 50%.
- Establecer el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de *Allium sativum* “ajo” al 25%.
- Establecer el efecto antimicrobiano del ciprofloxacino a 5µg.

II. METODOLOGÍA

2.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y TIPO DE INVESTIGACIÓN:

Tipos de estudio: Básico.

Diseño de investigación: Fue un experimento con repetición múltiple, post-prueba.

Considerando el esquema siguiente:

R G1	X ₁	O ₁
R G2	X ₂	O ₂
R G3	X ₃	O ₃
R G4	X ₄	O ₄
R G5	X ₅	O ₅
R G6	X ₆	O ₆

Reemplazando:

RG: Grupos de experimentación.

X₁: Extracto de etanol de *Allium sativum* al 100 %.

X₂: Extracto de etanol de *Allium sativum* al 75 %.

X₃: Extracto de etanol de *Allium sativum* al 50 %.

X₄: Extracto de etanol de *Allium sativum* al 25 %.

X₅: Control positivo: Ciprofloxacino con una concentración 5µg.

X₆: Control negativo: uso de cloruro de sodio al 0.9%.

O: estimaciones del diámetro de halo de inhibición.

2.2. Variables y operacionalización.

Variable independiente: Agente antibacteriano.

Agente antibacteriano no farmacológico: Extracto etanólico de *Allium sativum* “ajo”.

Agente antibacteriano farmacológico: Ciprofloxacino a la concentración de 5µg.

Variable dependiente: Efecto antibacteriano.

Eficacia antibacteriana: presencia de un halo inhibitorio de ≥ 21 mm.

No eficacia antibacteriana: presencia de un halo inhibitorio < 21 mm.

Operacionalización de variables:

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
V. I: Agente antibacteriano	Para el tratamiento de <i>Pseudomona aeruginosa</i> se utilizó: Tratamiento no farmacológico con Extracto etanólico de <i>Allium sativum</i> . ²⁰ Tratamiento farmacológico con ciprofloxacino. ²¹	El <i>Allium sativum</i> “ajo” fue dividido considerando las presentes diluciones: 100 % 75 % 50 % 25 % ciprofloxacino 5µg Cloruro de sodio 0.9%	 R G1 R G2 R G3 R G4 R G5 R G6	Cualitativa nominal
V. D: Efecto antibacteriano	Proceso en el que se inhibe el desarrollo y el crecimiento de microorganismos o eliminarlos sin ocasionar daños en el huésped infectado. ²²	Se usó el cálculo del halo inhibitorio a través de la metodología de Kirby Bauer. Se tomaron en cuenta los criterios del CLSI: ²³ Sensible: ≥ 21 mm Intermedio: 16 a 20 mm Resistente: ≤ 15 mm	 Eficaz: ≥ 21 mm No eficaz: < 21 mm	Cualitativa nominal

2.3. Población y muestra.

Población: Constituido por por cepas de *Pseudomona aeruginosa*, pertenecientes al Instituto De Medicina Tropical e Infectología de la facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

Muestra: Para seleccionar la muestra se consideró la fórmula para comparar dos promedios y estimar la existencia de diferencias entre las mismas.

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2\sigma^2}{(X_1 - X_2)^2}$$

n = 12, 7008 = 13 repeticiones

Dónde:

$$Z_{\alpha/2} = 1,96$$

$$Z_{\beta} = 0,84$$

$$X_1 = 21^{23}$$

$$X_2 = 23^8$$

$$\sigma^2 = 1,8^5$$

Unidad de análisis: Cada cepa de *Pseudomona aeruginosa*.

Unidad muestral: Cada unidad formadora de colonia de *Pseudomona aeruginosa*.

Método de muestreo: Aleatorio simple.

Criterios de inclusión: Cepa de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 con 18 a 24 horas de cultivadas.

Criterios de exclusión: Cepa de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 contaminadas.

2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.

Técnica: consistió en la visualización del desarrollo de colonias de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853.

Procedimiento: En la investigación se realizó los pasos siguientes:(ver anexo 02)

- a) El *Allium Sativum* fue reconocida de forma taxonómica por el Herbario Antenor Orrego en Trujillo. (Anexo 02)
- b) Se obtuvo el referido extracto etanólico de *Allium sativum*, utilizando la metodología de macerado con etanol.²⁴ (Anexo 2)
- c) Se utilizó el agar Muller-Hinton como medio de cultivo para cepas conformadas por *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, para el test de susceptibilidad, conforme las sugerencias del C.L.S.I mediante el estándar M 02 -A12.²⁵ (Anexo 2)
- d) Se evaluó la susceptibilidad antibacteriana cumpliendo con la normatividad y criterios contemplados en los estándares M100²³ del C.L.S.I. (Anexo 2)

Instrumento:

Se utilizó una ficha de recolección de datos, la cual se elaboró para el presente estudio, donde se obtuvo el número de placas, las diluciones y las mediciones de los halos de inhibición. (Anexo 03)

Validación y confiabilidad del instrumento.

La ficha de recolección de datos estuvo validada por opinión de tres profesionales (un médico y dos biólogos) quienes analizaron que los ítems en Microbiología. Los procedimientos para la prueba experimental ya se encuentran validados por el estándar M02-A12 y los valores de los halos de inhibición que determinan la sensibilidad del patógeno, también están validados por el estándar M100 del CLSI, que es la institución que da la confiabilidad. (Anexo 4)

2.5 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS.

El dato obtenido en los resultados fue tabulado en el programa Microsoft Excel 2013 y fueron sometidos a pruebas estadísticas en el Software estadístico SPSS v25. Se aplicó las pruebas estadísticas de análisis de varianza ANOVA y post hoc de Tukey. Asimismo, se utilizó el Diagrama de Cajas y bigotes para representar la comparación de la efectividad del extracto etanólico.

2.6 ASPECTOS ÉTICOS.

El estudio se realizó respetando los criterios de bioseguridad en el laboratorio con las personas y con el medio ambiente. Se consideró los protocolos de tratamiento de material potencialmente infeccioso y no exposición al peligro de las personas, según el “Manual de Bioseguridad en el Laboratorio” de la OMS.²⁶ (Anexo 5)

III. RESULTADOS.

Tabla 1 Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de *Allium sativum* “ajo” y ciprofloxacino a 5µg sobre *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 en investigación in vitro.

Datos Descriptivos

Concentraciones	N	Media	95% de intervalo de confianza para la media		Error Estandar	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
			Límite inferior	Límite superior				
25	13	9.9	9.4	10.4	0.2	0.9	9	11
50	13	13.4	12.9	13.8	0.2	0.8	12	14
75	13	14.1	13.5	14.7	0.3	1.0	12	15
100	13	19.7	18.9	20.5	0.4	1.3	17	22
Ciprofloxacino	13	31.5	30.8	32.1	0.3	1.1	28	32

Fuente: reporte de resultados del SPSS versión 25

INTERPRETACION

En la tabla 1 se observa la media de los halos de inhibición al 100% del extracto etanólico de *Allium sativum* “ajo” de 19,7 mm, DE: 1,3 (con un valor máximo de 22 mm y un mínimo de 17 mm), IC al 95% (de 18,9 – 20,5mm). No muestra tener efecto antibacteriano según lo observado por el CLSI (≥ 21 mm)²³, las diluciones de 75% a 25% los halos de inhibición fueron menores que varían entre 14,1 mm como máximo y 9,9 mm como mínimo. El ciprofloxacino demostró halos de inhibición media de 31,5 mm, DE: 1,3 \pm 0,4 (con un valor máximo de 32 mm y un mínimo de 28 mm), IC al 95% (de 30,8 – 32,1) considerado sensible según el CLSI (≥ 21 mm).

Tabla 2: Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de *Allium sativum* “ajo” comparado con el ciprofloxacino a 5µg sobre *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 en investigación in vitro.

ANALISIS DE VARIANZA ANOVA

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3712.5	4	928.1	885.0	0.000
Dentro de grupos	62.9	60	1.0		
Total	3775.4	64			

Fuente: reporte de resultados del SPSS versión 25

INTERPRETACION

En la tabla 2 nos indica que al realizar el análisis multivariado sobre el análisis de varianza de las diluciones en estudio (ANOVA) considerando la normalidad de los datos, el valor que se obtuvo fue altamente significativo ($p = 0.000$), existiendo diferencias entre los grupos de experimentación, por lo que es necesario realizar la prueba post anova de tukey para determinar quién tiene mejor efecto.

Tabla 3: Post Anova en el Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de *Allium sativum* “ajo” comparado con el ciprofloxacino a 5µg sobre *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 en investigación in vitro.

Pruebas Post Anova de Tukey

Subconjunto para alfa = 0.05					
Concentraciones	N	1	2	3	4
25	13	9.9			
50	13		13.4		
75	13		14.1		
100	13			19.7	
Ciprofloxacino	13				31.5
Sig.		1.0	0.4	1.0	1.0

Fuente: reporte de resultados del SPSS versión 25

INTERPRETACION

En la tabla 3 la prueba post anova de tukey separa el efecto en cuatro grupos, donde el ciprofloxacino resulta ser el más sensible con una media de 31.5mm seguido de la concentración de 100% con una media de 19.7mm, el tercer grupo de eficacia lo compone las concentraciones de 50% y 75% con una media de 13.4mm y 14.1mm, y el ultimo efecto le corresponde a la concentración de 25% con una media de 9.9 mm como se visualiza en el grafico 01.

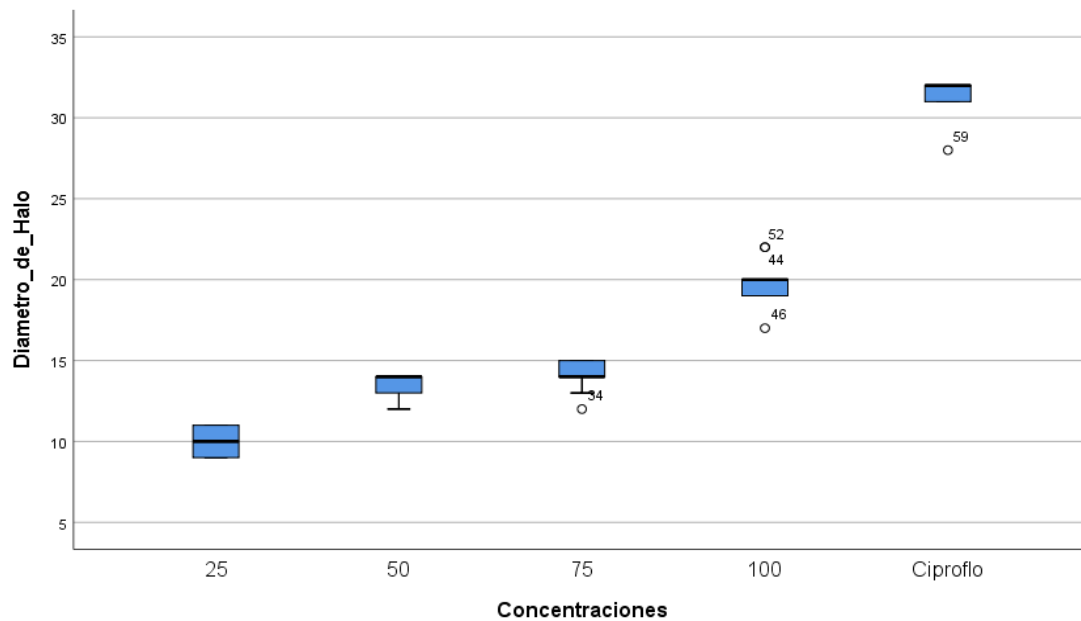


Grafico 1. Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de *Allium sativum* “ajo” sobre *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 tras comparar con ciprofloxacino a 5µg en investigación in vitro.

INTERPRETACION

En el grafico 1 se visualiza que el ciprofloxacino a 5µg muestra un halo de inhibición con valor mínimo de 30.8 mm, con una media de 31.5 mm y una máxima de 32.1 mm, también se visualiza que a mayor dilución del extracto etanólico de *Allium sativum* “ajo”, mayor es el halo de inhibición, donde observamos al 75% llegando a obtener 14.7mm y en el 100% hasta 20.5 mm como valores máximos, evidenciando que no tiene efecto inhibitorio, como el ciprofloxacino.

IV. DISCUSIÓN

En el presente estudio con el objetivo de evaluar la eficacia del extracto etanólico de *Allium sativum* “ajo” frente a ciprofloxacino a 5µg sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 se desarrolló un estudio in vitro donde se observó 13 placas por grupo con un total de 65 cultivos, en cada placa Petri se colocaron un total de 5 discos de los cuales 4 de ellos representaban el extracto de *Allium sativum* a distintas diluciones (100%, 75%, 50% y 25%), el patrón de ciprofloxacino a 5 µg, se consideró un control negativo con agua destilada y control positivo a ciprofloxacino considerando los procedimientos recomendados por el CLSI (≥ 21 mm).²³

En la tabla 1, se observa que el extracto etanólico de *Allium sativum* “ajo”, sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 no tuvo efecto antimicrobiano, sin embargo el ciprofloxacino (Gold estándar) si mostro halo de inhibición media de 31,5 mm, DE: $1,3 \pm 0,4$ (con un valor máximo de 32 mm y un mínimo de 28 mm), IC al 95% (de 30,8 – 32,1) considerado sensible según lo establecido por el estándar del instituto de estándares clínicos y de laboratorio CLSI (≥ 21 mm).

Comparado con el estudio realizado por **Johnson M, et al**⁵ encontraron propiedades antimicrobianas del extracto etanólico del ajo *Allium sativum* L, contra la *Pseudomonas aeruginosa*, a una concentración de 25,3 mg /mL, el diámetro del halo inhibitorio fue de $28,1 \pm 1,8$ mm.

Al igual que el estudio de **EL-mahmood M.**⁸ encontró propiedades antimicrobianas del extracto etanólico del *Allium sativum* L, contra *Pseudomonas aeruginosa*, a una concentración de 150 mg /mL, con diámetros de halo de inhibición de 23mm, sin embargo en el estudio realizado muestra variabilidad en los halos de inhibición, al 100% del extracto etanólico de *Allium sativum* “ajo” presento como límite inferior 18,9 mm y como límite superior 20,5 mm respectivamente, no supera el estándar del instituto de estándares clínicos y de laboratorio CLSI (≥ 21 mm) considerando no tener efecto antibacteriano.

Según **Wink M, Schimmer O.**²⁷ Evaluaron el efecto antibacteriano del ajo, atribuyendo principalmente al compuesto orgánico sulfurado alicina, es el compuesto biológico más activo del *Allium sativum* L, su acción antibacteriana se atribuye a la capacidad de unirse con el DNA, produciendo la ruptura de la membrana así mismo inactivación de las proteínas extracelulares al formar complejos irreversibles.

En la tabla 2, nos indica que al realizar el análisis multivariado (ANOVA), considerando la normalidad de los datos se comprobó que entre las diferentes concentraciones del extracto

etanólico de *Allium sativum* L, indican que el estudio estadístico fue altamente significativo (ANOVA $p=0.000$), implica que al menos una de las concentraciones del extracto etanólico de *Allium sativum* es mejor que otra, fue necesario realizar la prueba Post ANOVA. En la tabla 3, la prueba post ANOVA Tukey evidencia que a mayor dilución mayor es el halo de inhibición, al 100% se observa una media de 19,7 mm, al 75% con una media de 14,1 mm, al 50 % con una media de 13,4 y al 25% con una media de 9,9mm, también se observa que el ciprofloxacino a 5 μ g su halo de inhibición es mayor que las diluciones del extracto etanólico con una media de 31,5mm. Resultados similares al estudio de **Akintobi O, et al**⁷, quienes investigaron la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Allium sativum* sobre la *Pseudomona aeruginosa*, observando que los halos de inhibición aumentan de tamaño, cuando se aumenta la concentración de extracto etanólico de *Allium sativum*, obteniéndose un halo inhibitorio promedio de 7 mm, al usar una concentración de 1,3 gr de extracto etanólico el halo inhibitorio fue de 1,3 mm, mientras que una concentración de 1,6 gr el diámetro del halo inhibitorio se incrementó a 3 mm.

En el Gráfico 1, se visualiza que el ciprofloxacino a 5 μ g presenta mayor halo de inhibición en relación a las diferentes diluciones del extracto etanólico de *Allium sativum*, muestra un halo de inhibición con valor mínimo de 30.8 mm, y una máxima de 32.1 mm, con una media de 31.5 mm, también se visualiza que a mayor dilución del extracto etanólico de *Allium sativum* “ajo”, mayor es el halo de inhibición, evidenciando que el extracto etanólico de *Allium sativum* muestra no tener efecto antibacteriano comparado con el ciprofloxacino según criterios de del CLSI (≥ 21 mm), al comparar el presente estudio con otros autores como **Johnson M, et al**¹. Encontraron propiedades antimicrobianas del extracto etanólico del ajo *Allium sativum* L, contra la *Pseudomona aeruginosa*, con valores mayores a nuestro estudio, a concentración de 25,3mg/mL con halo de inhibición de 28,1 \pm 1,8 mm, al igual que **EL-mahmood M.**⁸ En su estudio encontró que el extracto etanólico de *Allium sativum* L, alcanzo halos de inhibición de crecimiento con diámetro de 23 mm.

Según el estudio de **Acosta L**²⁸, refiere que las diferencias encontradas en los resultados de los antecedentes de nuestra investigación podría estar condicionado o influenciado por el medio ambiente en el que se desarrolló el cultivo de la planta, en relación a la humedad, temperatura, altitud y componentes del terreno, elementos que influyen sobre el desarrollo y crecimiento de la planta que podrían estar alterando los componentes químicos y biológicos de la misma, ciertas condiciones determinan en las plantas la concentración de minerales, micronutrientes, lo que

explicaría la diferencia en los halos de inhibición en los diferentes países estudiado.

V. CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de *Allium sativum* “ajo” no tuvo efecto antimicrobiano sobre *Pseudomonas aeruginosa*, según los criterios del CLSI (≥ 21 mm).
- A diluciones del 100 %, el halo de inhibición alcanzó los 19,7mm.
- A dilución del 75%, el halo de inhibición fue de 14,1 mm.
- A dilución de 50%, el halo de inhibición fue de 13,4mm.
- A dilución de 25%, el halo de inhibición fue 9,9mm.
- El ciprofloxacino a 5 μ g presentó un halo de inhibición media de 31,5mm.

VI. SUGERENCIAS

- Se recomienda ampliar el estudio utilizando el ajo de otras zonas de la sierra del Perú para evaluar si la temperatura, suelo, clima influyen en la concentración de los componentes fitoquímicos de la planta que le dan el efecto antibacteriano.
- Se recomienda realizar estudios de ajo con extractos alcohólicos y confrontarlos con diversos patógenos bacterianos y fúngicos.
- Se sugiere realizar estudios del efecto antibacteriano de la planta en modelos animales.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Sistema mundial de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2017.
2. Organización Mundial de la Salud. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Washignton. OMS. 2017.
3. Chalar L, Sejas M, Moya C, Romero B, Vargas E. Función Antimicrobiana de la Alicina de Ajo en cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*. Rev Cient Cienc Méd. 2014, [citado el 23 de agosto de 2018]; 17(1): 26-28. Disponible en: <http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sciarttext&pid=S1817-74332014000100008>
4. Villa M, Meléndez M, Leal L, Cortés A, Meneses A, *Pseudomona aeruginosa* resistente a antimicrobianos en hospitales colombianos. Rev. chil. infectol. 2013, [citado el 23 de septiembre de 2018]; 30(6): 605-610. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182013000600005
5. Johnson M, Nurudeen O, Simeon O. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Aqueous Garlic (*Allium sativum*) extract against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. British Microbiology Research Journal 2016. 14(1): 1-11.
6. Zouari R, Hamrouni I, Snoussi A, Bouzouita N. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of Tunisian garlic (*Allium sativum*) essential oil and ethanol extract Mediterranean Journal of Chemistry 2014, [citado el 15 de septiembre de 2018]; 3(4), 947-956. Disponible en: <http://www.medjchem.com/index.php/medjchem/article/viewFile/37/15>
7. Akintobi O, Idowu A, Nwanze J, Onianwa O, Okonko I. Antimicrobial Activity of Allium sativum (Garlic) Extract against Some Selected Pathogenic Bacteria. Nat Sci 2013; [citado el 10 de agosto de 2018]; 11(1):1-6. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/262187667_Antimicrobial_Activity_of_Allium_sativum_Garlic_Extract_against_Some_Selected_Pathogenic_Bacteria
8. EL Mahmood E. Efficacy of crude extracts of garlic (*Allium sativum* Linn.) against nosocomial *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* Journal of Medicinal Plants Research April, 2009; 3(4):179-185.

9. Campos C, López L. Efecto Inhibitorio in vitro del Extracto Acuoso de *Allium sativum* L. "AJO" frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. Multirresistentes Aisladas del Hospital Regional de Lambayeque. [Tesis en internet]. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. [Chiclayo - Perú] 2017. [Citado el 19 de agosto de 2017] Disponible en: <http://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/124372>
10. Maguiña C. Uso racional de antibióticos. 2da edición. Lima Logargraf. 2016.
11. Acton A. *Pseudomonas aeruginosa*: New Insights for the Healthcare Professional. Atlanta Scholarly edition. 2013, [citado el 10 de septiembre de 2018]; 3(4), 47-56. Disponible en; https://books.google.com.pe/books?id=p8yl9aTYg1QC&pg=PA36&dq=microbiologia+pseudomona+aeruginosa&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwju2IOT2NTVAhWPdSYKHeW_Dp84FBDoAQgsMAE#v=onepage&q=microbiologia%20pseudomona%20aeruginosa&f=false
12. Murray P, Rosenthal K, Pfalle M. Microbiología Médica. 7a edición. Rio de Janeiro. Elsevier-Saunders. 2014.
13. Mendiola L. El ajo (*Allium sativum* L.) y el ajo de oso (*Allium ursinum*). Universidad Autónoma de México Disponible en: http://www.cienciorama.unam.mx/a/pdf/147_cienciorama.pdf
14. Natura foundation. *Allium Sativum*. Holland. Mastering health. 2012, [Citado el 17 de agosto de 2018]; Disponible en: <http://www.naturafoundation.es/?objectID=45&action=pdf&id=39907>.
15. Lorenzo P, Moreno A, Leza J, Lizasoain I, Moro M, Portolés A. Velázquez. Farmacología Básica y Clínica. 18ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 2008.
16. Strasser G. La eficacia terapéutica desde el punto de vista de los sujetos en un contexto de pluralismo médico. Scripta Ethnologica 2014 [citado el 3 de abril del 2018], pp. 78-106. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/148/14832692003.pdf>
17. Valero L. Epidemiología general y demografía sanitaria. Salamanca. Universidad de Salamanca: 2011, pp 3-5.
18. Torres C. La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. Zaragoza Colegio oficial de Farmacéuticos de Zaragoza. 2012.
19. Torres C. La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. Zaragoza Colegio oficial de Farmacéuticos de Zaragoza. 2012.
20. Mercado P, Arévalo L. Sensibilidad de cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa* frente a la acción antibacteriana del extracto de *Allium sativum* "Ajo". 2013; 33(1).

21. Fernández D, Ruiz M. Fundamentos de Farmacología Básica y Clínica. 2da ed. España: Edit. Médica Panamericana; 2013.
22. Calvo J, Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009; [citado el 2 de abril de 2018]; 27(1): 44–52. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-mecanismos-accion-los-antimicrobianos-S0213005X08000177>
23. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28 ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. [citado el 14 de agosto de 2018]; Disponible en: <http://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2018-M100-S28-unlocked.pdf>.
24. Carrión A, García C. Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia metódica. [Tesis de titulación]. Cuenca, Ecuador: Universidad de Cuenca; 2010. [citado el 8 de septiembre del 2018]; Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2483/1/tq1005.pdf>
25. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015. [citado el 17 de octubre del 2018]; Disponible en: <http://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2015-M02-A12-original.pdf>
26. Organización Mundial de la Salud. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3ra. Edición. Ginebra: Ediciones de la OMS; 2005.
27. Wink M, Schimmer O. Modes of action of defensive secondary metabolites. *Pharmacognosy Rev*. 2014 [citado el 18 agosto de 2018]; 9 (7): 361-383. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25125881>.
28. Acosta de la luz L. Principios agroclimáticos básicos para la producción de plantas medicinales. *Rev cubana Plant Med*. 2003 [citado el 15 febrero de 2019]; 7 (6): 361-383. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962003000100008.

VIII. ANEXOS

ANEXO 01

TAMAÑO DE MUESTRA

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2\sigma^2}{(X_1 - X_2)^2}$$

n = 12, 7008 = 13 repeticiones

Dónde:

$$Z_{\alpha/2} = 1,96$$

$$Z_{\beta} = 0,84$$

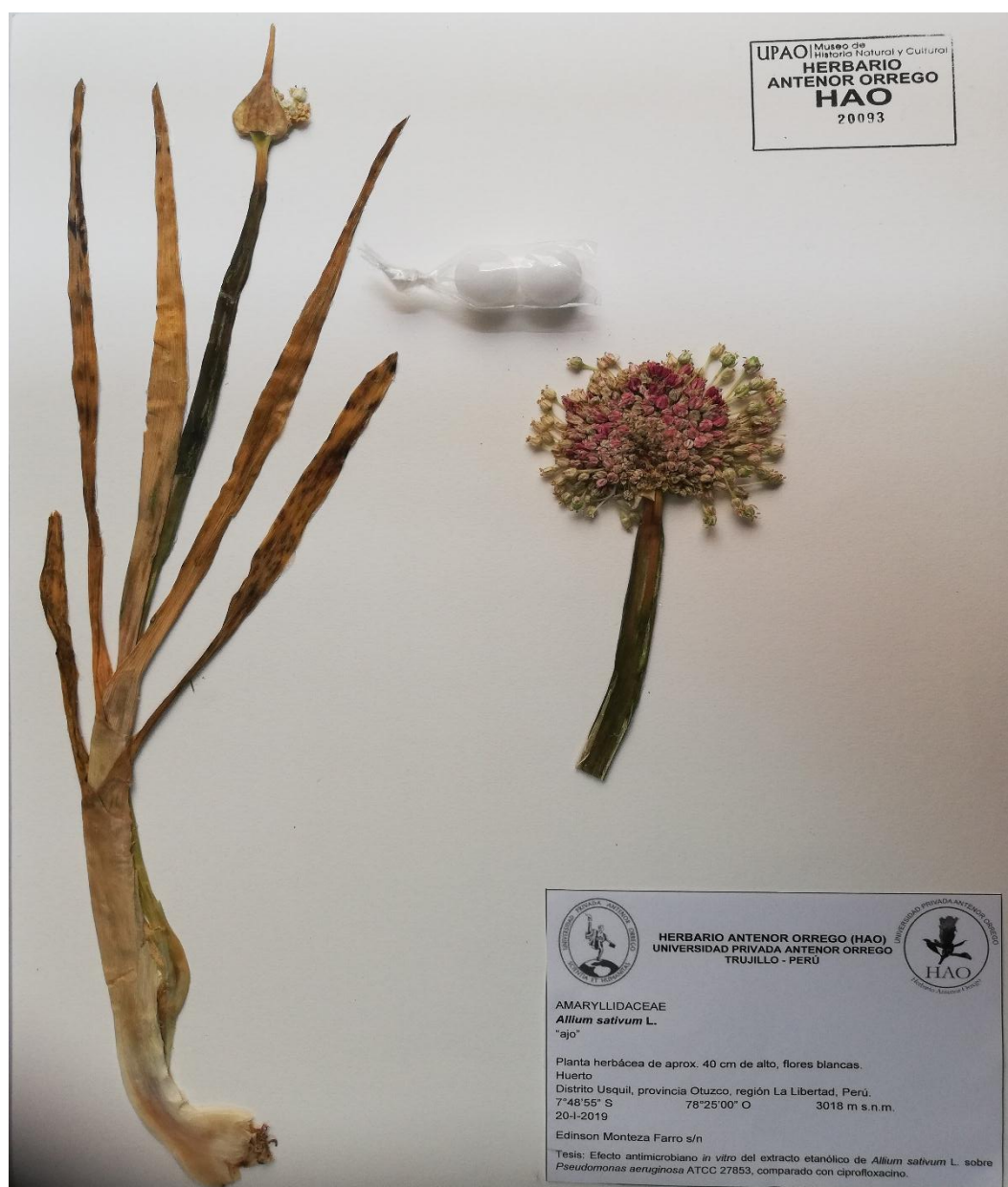
$$X_1 = 21^{23}$$

$$X_2 = 23^8$$

$$\sigma^2 = 1,8^5$$

ANEXO 02

Identificación Taxonómica de *Allium sativum* “ajo”



ANEXO 02

Procedimiento para el extracto etanólico de *Allium sativum* “ajo”

1. Tratamiento de la muestra

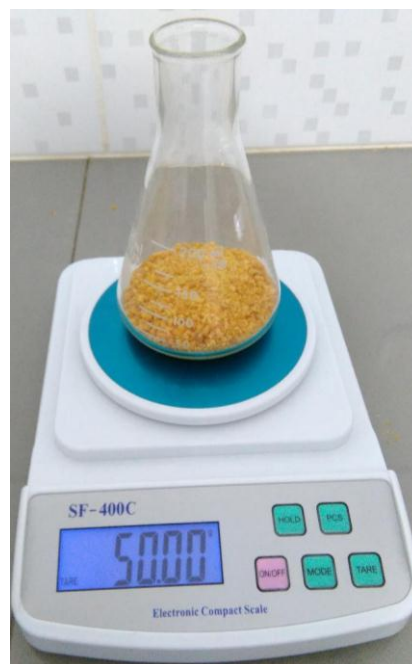
El material herbolario fresco de *Allium sativum* “ajo”, oriundas de la provincia de Otuzco, Región La Libertad, se obtuvo en el mercado La Hermelinda de Trujillo, en una cantidad de 2.5 Kilos aproximadamente, trasladándose posteriormente al ambiente de laboratorio de Microbiología “San José” de Trujillo, con el fin de seleccionar los bulbos en condiciones óptimas; de esta manera, se obtuvo “especímenes frescos” (EF). El espécimen fresco fue lavado con agua clorada destilada y se cortó en trozos pequeños utilizando un multiprocesador de verduras Oster. Posteriormente se trasladó al horno con una temperatura de 30 hasta 35°C por espacio de tres a cuatro días para su deshidratación. Posteriormente tras un proceso de molienda con un mortero con el fin de obtener partículas y se preservarán almacenando dicha muestra de manera hermética en bolsas plásticas de color negro.





2. Obtención del extracto etanólico

El extracto etanólico del *Allium sativum* se consiguió aplicando la metodología de maceramiento en líquido etanólico; para lo cual, se conservó en un contenedor de vidrio con 20 gramos de MS y 100 mililitros de alcohol etílico al 96º, trasladándose hacia una estufa a temperatura de 40ºC por espacio de ocho días, agitándola constantemente. Posteriormente se realizó doble filtrado. Se inició el filtrado usando una gasa esterilizada y posteriormente mediante un papel filtro Whatman Nº41. Esta filtración, se trasladó a una estufa por espacio de una a dos días, hasta que se obtuvo el producto de la filtración con densidad cercana al que tiene la miel de abejas. De esta manera, se logró el extracto etanólico (EE) a una concentración del 100%; la misma que se preservó en un contenedor de vidrio color ámbar a temperatura de 4º C.





ANEXO 2

Preparación del medio de cultivo

Se aplicó el agar Mueller - Hinton para su cultivo, se realizó la preparación necesaria con el fin de usarlo en las placas Petri establecidas. Inicialmente este medio para el cultivo se hizo la esterilización en una autoclave a 121 °C por espacio de quince minutos. Posteriormente se extrajo 18-20 ml por cada Placa Petri estériles de plástico desechables, y se tuvo en reposo hasta conseguir de manera completa su solidificación.

Evaluación de la susceptibilidad antibacteriana (Prueba de Disco difusión)

Se realizó la evaluación mediante el método de Kirby-Bauer de disco difusión en agar, tomándose en cuenta los pasos y criterios del Clinical and Laboratory for Standards Intitute (C.L.S.I). Se tomó en consideración los criterios estandarizados de la M02-A12 y M100.

a) Preparación del inóculo

El inóculo se preparó introduciendo tres a cuatro mililitros de suero fisiológico al 0.9% en el interior del tubo de ensayo estéril, adicionándose una alícuota de la bacteria *Pseudomona aeruginosa*, que se cultivara previamente de 18 hasta 20 horas, de tal manera que se aprecie la existencia de turbidez parecido al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL).



b) Siembra del microorganismo

Se hizo la siembra de la *Pseudomona aeruginosa*, utilizando un hisopo esterilizado embebido en el inóculo y desplazándolo en la superficie de la placa del cultivo Petri (sembrándolo en la superficie en forma de estría); de manera que la bacteria permanezca como una capa sobre la superficie.



c) Preparación de las concentraciones del Extracto Etanólico.

A partir del extracto etanólico se prepararán 4 concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%) utilizando como solvente Dimetil Sulfoxido (DMSO); para ello, se rotularon 4 tubos de ensayo de 13x100mm estériles con las 4



concentraciones y se colocaron 750 μL de EE y 250 μL de DMSO al tubo de 75%, 500 μL de extracto etanólico y 500 μL de DMSO al tubo de 50%, y 250 μL de extracto etanólico y 750 μL de DMSO al tubo de 25%.



d) Preparación de los discos de sensibilidad con extracto etanólico.

Considerando de manera individual cada concentración, se agregó 10 μL en los discos que contenían papeles de filtro Whatman Nº 1 con un diámetro de 6 mm, anticipadamente se esterilizo. Se usó 10 μL de extracto etanólico a una dilución que alcance el 25% y se introdujo en cada disco, 10 μL de AE al 50% en otros discos, 10 μL de extracto etanólico al 75% aplicados en otros discos y 10 μL de extracto etanólico al 100% en los últimos discos. El proceso se realizó repitiéndolo en trece oportunidades.





e) Confrontación del microorganismo con el agente antimicrobiano

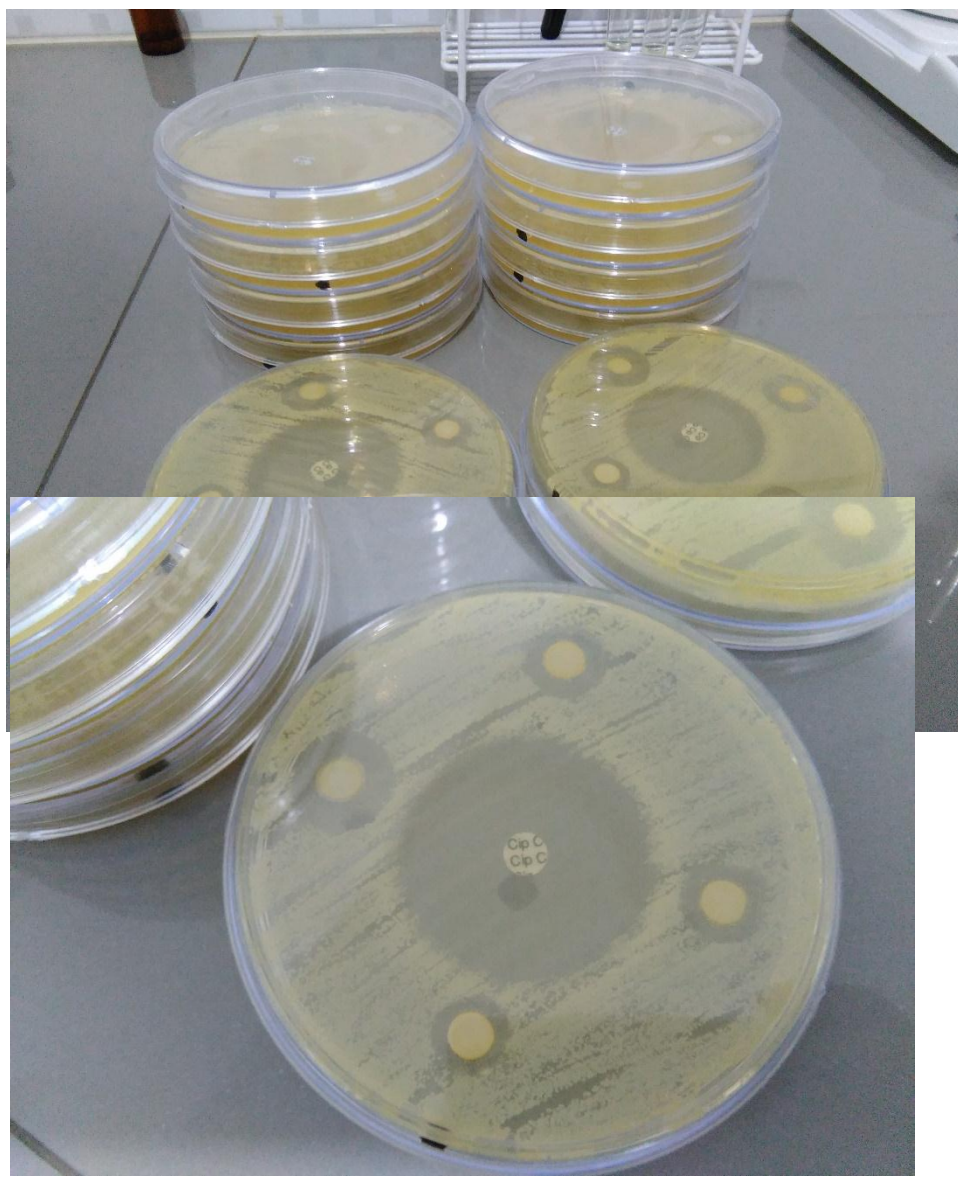
Ayudándose con la pinza metálica previamente esterilizada, se cogió los discos de sensibilidad que se prepararon con cada concentración de extracto etanólico y se aplicó en la superficie del agar sembradas con *Pseudomona aeruginosa*, de manera que permaneció en los discos (cada uno con la concentración correspondiente) a 1 cm del borde de las Placas Petri y colocándolos equidistantemente. Además, se agregó al disco el ciprofloxacino en una cantidad de 5µg (control positivo). Se reposó por espacio de quince minutos y posteriormente dichas placas se invirtieron y se trasladó a la incubadora a temperatura entre 35 hasta 37°C por espacio de dieciocho a veinte horas.





f) Lectura e interpretación

Se realizó la respectiva lectura visualizando y estimando con una regla de Vernier, la zona de inhibición considerando su diámetro de crecimiento bacteriano. La estimación se hará en cada concentración de extracto etanólico y para el ciprofloxacino. Se clasificó como sensible o resistente, de acuerdo a lo establecido por los criterios del C.L.S.I.



ANEXO 3
FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

ZONA DE INHIBICIÓN (mm)						
Nº	Extracto etanólico de <i>Allium sativum</i>				Ciprofloxacino 5µg	Suero fisiológico
	100%	75%	50%	25%		
1	19	15	14	9	32	0
2	20	14	12	10	31	0
3	20	14	14	10	32	0
4	19	15	13	11	32	0
5	22	13	14	9	32	0
6	19	14	12	11	31	0
7	17	15	13	11	28	0
8	20	12	13	9	31	0
9	19	15	14	9	32	0
10	20	14	14	10	32	0
11	20	14	14	10	32	0
12	19	15	13	11	32	0
13	22	13	14	9	32	0

Anexo 4

VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

ÍTEM	CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA VALIDEZ				CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS ESPECÍFICOS							
	CONTENIDO (Se refiere al grado en que el instrumento refleja el contenido de la variable que se pretende medir)		CONSTRUCTO (Hasta donde el instrumento mide realmente la variable, y con cuanta eficacia lo hace)		RELEVANCIA (El ítem es esencial o importante, es decir, debe ser incluido)		COHERENCIA INTERNA (El ítem tiene relación lógica con la dimensión o el indicador que está midiendo)		CLARIDAD (El ítem se comprende fácilmente, es decir, sus sintácticas y semánticas son adecuadas)		SUFICIENCIA (Los ítems que pertenecen a una misma dimensión bastan para obtener la dimensión de esta)	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
1	X		X		X		X		X		X	
2	X		X		X		X		X		X	
3	X		X		X		X		X		X	

CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS GENERALES				SI	NO	OBSERVACIÓN
El instrumento contiene instrucciones claras y precisas para responder la ficha de cotejos				X		
Los ítems permiten el logro del objetivo de la investigación				X		
Los ítems están distribuidos en forma lógica y secuencial				X		
El número de ítems es suficiente para recoger la información. En caso de ser negativa la respuesta sugiera los ítems a añadir				X		
VALIDEZ						
APLICABLE	X	NO APLICABLE		APLICABLE TENIENDO EN CUENTA OBSERVACIÓN		

Instrumento validado por:

Firma y sello

 Jaime A. Polo Gumbao
 MICROBIOLOGO
 CDP 4251

Firma y sello

 UNIVERSIDAD CESAR VALLEJO
 FACULTAD CIENCIAS BÁSICAS
 UCV
 MSc. David García Cejón
 DOCENTE T.P. ESCUELA MEDICINA
 UCV, CAMPUS TRUJILLO

Firma y sello

 Manuel B. Chávez Rimarachin
 MEDICINA INTERNA
 CDP 4254 RES 2000

Anexo 5

Bioseguridad para el área de laboratorio clínico

- Se Utilizó permanentemente en el área de trabajo los elementos de protección personal: mascarilla, gorro, bata blanca y guantes.
- Cuando el procedimiento lo amerite o se presuma un probable riesgo de Salpicadura, usar delantal plástico.
- Los recipientes para muestras pueden ser de vidrio o, preferiblemente, de plástico. Deben ser fuertes y no permitir fugas cuando la tapa o el tapón estén correctamente colocados.
- Se Realizó los procedimientos empleando las técnicas correctas para minimizar el riesgo de salpicaduras o derrames.
- Si se usó pipetas automáticas para evitar cualquier riesgo de contaminación oral. El pipetear líquidos con la boca es una práctica inadecuada y altamente riesgosa.
- Las cánulas, tubos contaminados y demás elementos de trabajo deben someterse a procesos de desinfección, desgerminación y esterilización en autoclave; igual tratamiento deberá darse a las cánulas, tubos y demás elementos de trabajo.
- A los tubos de ensayo con sangre en coágulos, se les debe colocar hipoclorito de sodio a 5000 ppm. durante 30 minutos, taparlos y una vez desechado este contenido, proceder a la desgerminación y esterilización mediante calor húmedo o seco para su posterior reutilización.
- Los demás fluidos orgánicos (flujos, cultivos, entre otros) deben tratarse mediante desinfección con hipoclorito a 5.000 ppm. durante 30 minutos.
- El material contaminado que deba ser desechado fuera del laboratorio, debe introducirse en recipientes resistentes, que se cerrarán antes de sacarlos del laboratorio, estos a su vez se depositaran en bolsa Roja rotulada como: “Riesgo Biológico – material contaminado a incinerar”, y entregarla al personal del Aseo para su disposición final.
- Los procedimientos que entrañan manipulación de cultivos de células infectadas, manejo de material con elevadas concentraciones de bacterias y actividades que generen aerosoles o gotitas como en los procedimientos de homogeneización y mezcla rigurosa, deben llevarse a cabo utilizando cabinas de seguridad biológica.
- El personal de Microbiología, debe utilizar además del equipo de protección personal básico, la mascarilla de alta eficiencia.

Anexo 6

Comparaciones múltiples

(I) Concentraciones			Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	25	50	-3,462 [*]	0.402	0.000	-4.59	-2.33
		75	-4,154 [*]	0.402	0.000	-5.28	-3.02
		100	-9,769 [*]	0.402	0.000	-10.90	-8.64
		200	-21,538 [*]	0.402	0.000	-22.67	-20.41
	50	25	3,462 [*]	0.402	0.000	2.33	4.59
		75	-0.692	0.402	0.428	-1.82	0.44
		100	-6,308 [*]	0.402	0.000	-7.44	-5.18
		200	-18,077 [*]	0.402	0.000	-19.21	-16.95
	75	25	4,154 [*]	0.402	0.000	3.02	5.28
		50	0.692	0.402	0.428	-0.44	1.82
		100	-5,615 [*]	0.402	0.000	-6.75	-4.49
		200	-17,385 [*]	0.402	0.000	-18.51	-16.25
	100	25	9,769 [*]	0.402	0.000	8.64	10.90
		50	6,308 [*]	0.402	0.000	5.18	7.44
		75	5,615 [*]	0.402	0.000	4.49	6.75
		200	-11,769 [*]	0.402	0.000	-12.90	-10.64
	200	25	21,538 [*]	0.402	0.000	20.41	22.67
		50	18,077 [*]	0.402	0.000	16.95	19.21
		75	17,385 [*]	0.402	0.000	16.25	18.51
		100	11,769 [*]	0.402	0.000	10.64	12.90

Prueba de homogeneidad de varianzas

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Diametro_de _Halo	Se basa en la media	0.382	4	60	0.821

Anexo 7

CONSTANCIA DE ASESORÍA DE DESARROLLO DE TESIS



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO



CONSTANCIA DE ASESORÍA DE DESARROLLO DE TESIS

El que suscribe **MG. BLGO. POLO GAMBOA, JAIME ABELARDO**, Docente de la Facultad de Ciencias Médicas, Escuela Académico Profesional de Medicina.

CERTIFICA:


Que, de conformidad con el Reglamento para elaboración y evaluación de Proyectos de Tesis para obtener el Título Profesional Médico Cirujano, del alumno: **EDINSON MONTEZA FARRO**, de esta casa de estudios, está trabajando bajo mi asesoramiento el Proyecto de Tesis titulado:

EFFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Allium sativum* L. SOBRE *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, COMPARADO CON CIPROFLOXACINO

Que será presentado para optar el Título anteriormente mencionado.


En tal virtud, asumo el asesoramiento de dicho proyecto, en calidad de Asesor técnico, tarea voluntaria y de cooperación académica con la Escuela de Medicina.

Expedido el presente a solicitud de la parte interesada para los fines académicos que estime conveniente, la Ciudad de Trujillo a los 17 días del mes de enero del 2019.


Jaime A. Polo Gamboa
MICROBIOLOGO
COP 0231

Anexo 8

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE TESIS




San Jose
LABORATORIO CLINICO
Calidad y profesionalismo el servicio de tu salud

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO

El Laboratorio "San José" deja constancia que ha prestado sus instalaciones, en donde el Sr. EDINSON MONTEZA FARRO estudiante de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo, ejecutó la parte experimental de su proyecto de tesis titulado "Efecto antimicrobiano in vitro del extracto etanólico de *Allium sativum* L. sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, comparado con ciprofloxacino", durante los días 24 al 31 de enero de 2019, bajo la orientación y asesoramiento del Microbiólogo Jaime Abelardo Polo Gamboa.

Se expide la presente a solicitud del estudiante, sólo para fines académicos, a los 5 días del mes de febrero de 2019.



José Luis Calla Queveco
BIOLOGO - MICROBIÓLOGO
C.B.P. 8301

Sede Principal: Francisco Bolognesi 678 Of. 203 - Centro Histórico - Trujillo
Sucursales: Los Corales 277- Barrio Médico Urb. Santa Inés - Trujillo
☎ 769999 - ☎ 948649844
✉ sanjoselabs@hotmail.com 🌐 www.sanjoselabs.amawebs.com/

Anexo 9

TRADUCCIÓN DE RESUMEN



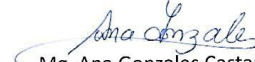
ABSTRACT

The antimicrobial effect of ethanol extract of *Allium sativum* "garlic" at dilutions of 100, 75, 50 and 25% on *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 strains was evaluated, compared with Ciprofloxacin at 5 µg. Thirteen repetitions were performed for each study group. Six discs were placed on each Petri-dish, 4 with *Allium sativum* extract at different dilutions, plus Ciprofloxacin at 5 µg, and neutral control with DMSO. The mean zone of inhibition obtained for 100% *Allium sativum* ethanol extract was 19.7 mm (SD: 1.3, maximum value of 22 mm and 17 mm. 95% CI [18.9 - 20.5], not exceeding that established by CLSI (≥ 21 mm). Ciprofloxacin demonstrated mean zones of inhibition of 31.5 mm (SD: 1.3 ± 0.4 mm, maximum value of 32 mm and minimum of 28 mm, 95% CI [30.8 - 32.1]. ANOVA was highly significant (0.000; $p < 0.01$). The post-ANOVA Tukey-test showed that the higher the concentration, the greater the inhibitory effect. It is concluded that ethanol extract of *Allium sativum* "garlic" showed an antimicrobial effect on *Pseudomona aeruginosa*, and smaller than Ciprofloxacin, according to CLSI criteria (≥ 21 mm).

Keywords: Ethanol extract, *Allium sativum*, *Pseudomona aeruginosa*, Ciprofloxacin, Antimicrobial effect.

This document has been translated by the Translation and Interpreting Service of Cesar Vallejo University and it has been revised by the English native speaker: Mark Stables.




Mg. Ana Gonzales Castañeda
Lecturer of the School of Languages